

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СОГЛАСОВАНО

Заместитель начальника по науке
Главного управления кадровой
политики, учебных заведений и науки

" " Н. И. Доста
" " 2000 г.

УТВЕРЖАЮ
Первый заместитель министра
В. М. Ореховский
" " 2000 г.
Регистрационный № 2000-0000

**Использование лабораторных магнитных сепараторов
типа "БЕЛСЕП" для выделения очищенных клеточных
популяций из клеточных суспензий**

Методические рекомендации

Витебск, 2000

Учреждение-разработчик: Витебский ордена Дружбы народов медицинский университет, Центральная научно-исследовательская лаборатория.

Авторы: научные сотрудники - Л. В. Тихонова, Ж. В. Хотетовская, д. б. н. О -Я. Л. Бекиш, д. м. н. Г. Я. Хулуп, д. м. н. А.П. Солодков.

Рецензенты:

М.П. Потапнев, д.м.н., зам. директора по научной работе Республиканского научно-практического центра детской онкологии и гематологии;

А.Л. Усс, к.м.н., руководитель Республиканского центра трансплантации костного мозга, зам. глав. врача по лечебной работе 9-ой городской клинической больницы.

Аннотация

Библиотека ВГМУ



Основой для написания методических рекомендаций явились исследования, проведенные в Центральной научно-исследовательской лаборатории Витебского ордена Дружбы народов медицинского университета. В рекомендации описаны разработанные авторами современные методические подходы для выделения клеток-мишеней с помощью иммуномагнитной сепарации. Описаны и даны характеристики сепараторов "Белсеп-Л01" и "Белсеп-Л05", предложены методы выделения клеток из суспензии периферической крови для клинико-лабораторных и научных исследований.

Методические рекомендации предназначены для врачей иммунологов, гематологов, онкологов, вирусологов, сотрудников научно-исследовательских лабораторий, а также для врачей-лаборантов, занятых проблемами изоляции клеток крови и костного мозга, выделения бактерий и различных антигенов.

Методические рекомендации утверждены Минздравом Беларуси в качестве официального документа.

Введение

Клеточная сепарация является одним из современных методов, активно применяемых в медицине для диагностических и лечебных целей. Это метод, благодаря которому одна или более клеточных субпопуляций могут быть выделены из суспензии. Он представлен различными методическими подходами: обработка моноклональными клеточными антителами + комплемент, моноклональными антителами + иммунотоксин (рицин), Е-розеткодеплегация, элютриация, агглютинация пектином сои, иммуноадсорбция на колонке, иммуномагнитосепарация.

Метод иммуномагнитной сепарации является современным и наиболее эффективным методом, как более мягкая процедура очистки, при которой с одновременным удалением подавляющегося большинства клеток-мишеней сохраняется их жизнеспособность и жизнеспособность оставшейся популяции.

В ЦНИЛ ВГМУ был разработан комплекс для иммуномагнитной сепарации клеток-мишеней из суспензии, состоящий из иммуноактивных микросфер (ИММС) и магнитного сепаратора (Белсеп-Л), который можно приобрести в ЦНИЛ ВГМУ, а также заказать в ПКП «Руслан», 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, ЦНИЛ, тел. (0212) 242509, факс (0212) 372107.

В странах СНГ в настоящее время магнитные сепараторы не выпускаются, хотя потребность их для использования в клинической практике постоянно возрастает, что частично компенсируется импортными поставками фирмами "Dynal", Норвегия, "Baxter", США, "Milteynyi Biotec", Германия, и отечественными - "Белсеп - Л", Беларусь.

Предложенный нами комплекс позволяет выделять из клеточных суспензий различные типы клеток по их мембранным антигенам в зависимости от выбора моноклональных антител:

- Т- и В-лимфоциты крови - для идентификации подвариантов острых и хронических лейкозов лимфоцитарного происхождения и определения иммунного статуса организма;
- Стволовые клетки (CD34+);
- Эпителиоциты;
- Макрофаги;
- Опухолевые клетки;
- Ретикулоциты и др.

В настоящих методических рекомендациях изложены современные представления об использовании иммуномагнитосепарации для выделения клеток-мишеней и дано обоснование оптимального использования предложенного нами комплекса.

ИММУНОМАГНИТНАЯ СЕПАРАЦИЯ

Необходимым условием проведения иммуномагнитной сепарации клеток-мишеней из суспензии является наличие:

- иммуномагниточувствительных микросфер (ИММС);
- моноклональных антител (МКАТ);
- магнитного сепаратора;
- лабораторного оборудования, посуды и растворов

Магниточувствительные микросферы (ММС)

Магниточувствительные микросферы являются суперпарамагнитными монодисперсными полимерными частицами. Они содержат в своей структуре равномерно распределенный по объему магнитный материал, который под действием внешнего магнитного поля приобретает собственный магнитный момент (намагничивается до насыщения). Полимер тонким слоем покрывает частицы магнетита и определяет поверхностные характеристики микросфер (форму, размер).

Микросферы являются твердофазными носителями МКАТ. Они конъюгированы с панелью моно-поликлональных антител, обладающих специфической иммунологической восприимчивостью к определенным клеткам в зависимости от наличия на их поверхности типа кластеров дифференцировки – CD. Это дает возможность образовывать комплексы микросферы – клетка (КМК) посредством связи антиген-антитело, а наличие включения в них магнетита позволяет быстро и избирательно выделять КМК с помощью магнитного сепаратора.

Различают:

Первичнопокрытые ММС (ПММС). Готовы к использованию и добавляются непосредственно к клеточной суспензии. Они могут быть покрыты первичными МКАТ, которые прямо посажены на поверхность микросферы, или через вторичные антитела, специфические к первичным.

Вторичнопокрытые ММС (ВММС). Различные мышинные, крысиные или кроличьи поликлональные или моноклональные антитела, которые могут быть использованы в клеточной сепарации после инкубации их с вторичнопокрытыми ММС.

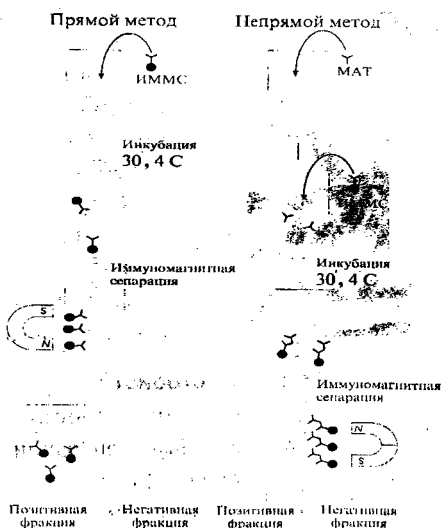
Непокрытые активированные ММС (АММС). На АММС перед экспериментом могут быть посажены специфические поли или моноклональные антитела и лиганды.

Типы иммуномагнитной сепарации

Прямой метод – при котором магнитные микросферы, первично покрытые моноклональными антителами, добавляют непосредственно к суспензии клеток. В процессе инкубации образуются комплексы ИММС с клетками-мишенями. Эти комплексы могут быть удалены из суспензии с помощью магнитного сепаратора.

Непрямой метод – при этом методе клетки-мишени метятся первичными моноклональными антителами, которые добавляют к суспензии клеток. После периода инкубации свободные не связавшиеся МКАТ отмывают центрифугированием и только затем к этой суспензии клеток добавляют магнитные микросферы, покрытые вторичными моно- или поликлональными антителами. В процессе инкубации вторичнопокрытые магнитомикросферы связываются с клетками мечеными первичными МКАТ. Эти комплексы также могут быть удалены с помощью магнитного сепаратора.

Таким образом, прямой метод более экономичен по использованию количества МКАТ и времени для проведения полной сепарации, однако непрямой метод более эффективен при одновременном выделении нескольких клеток-мишеней из суспензии.



Позитивная сепарация - выделение и концентрация интересующих клеток из исследуемого объекта. Она используется обычно в прямом методе и позволяет выделять клетки с высокой степенью очистки.

Негативная сепарация - метод, с помощью которого клеточная популяция очищается путем удаления всех других типов клеток из исследуемого материала. Негативная изоляция может быть проведена как прямым, так и непрямым методом.

«БЕЛСЕП Л-01»

- | | |
|--|--------------------|
| - эффективность выделения клеток-мишеней | 95-99% |
| - емкость задерживаемых клеток | 1х 10 ⁸ |
| - объем обрабатываемой пробы | 1,5см |
| - индукция магнитного поля | 0,5Тл |
| - градиент индукции магнитного поля | 30Тл/м |
| - условия использования, хранения | +4...+40° С |

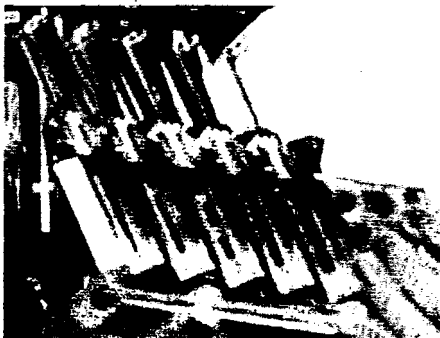


Устройство состоит из корпуса, выполненного из немагнитного материала, в котором имеются гнезда для установки двух пробирок.

На уровне нижней трети высоты пробирки в корпусе закреплен постоянный магнит цилиндрической формы, намагниченный вдоль оси. Пробирки закрепляются в гнездах пружинными прижимами.

«БЕЛСЕП Л-05»

- | | |
|--|-----------------------|
| - эффективность выделения клеток-мишеней | 95-99% |
| - емкость задерживаемых клеток | 1х10 ⁹ /мл |
| - объем обрабатываемой пробы | 5 мл |
| - индукция магнитного поля | 0,125Тл |
| - условия использования, хранения | +4...+40° С |



Сепаратор выполнен в виде настольного штатива из немагнитного материала, в который устанавливается до 10 пробирок объемом 10 мл каждая с обрабатываемым материалом.

Сепарация осуществляется магнитным полем постоянных магнитов, укрепленных в подвижной вставке. По окончании сепарации вставка с магнитами извлекается.

Работа устройств:

В гнезда корпуса устанавливают пробирки с разделяемыми биологическими продуктами, подлежащими сепарации. После определенной экспозиции, которая зависит от желаемой степени разделения и свойств разделяемых фракций, иммуномагнитный комплекс выделяется на стенках пробирок, а свободную фракцию отсасывают с помощью пипетки.

Основной протокол сепарации.

В зависимости от объема полученной лейкосуспензии или мононуклеарной взвеси с концентрацией, необходимой для проведения опыта, предлагаем использовать сепаратор «БЕЛСЕП-Л01» для объема меньше 2 мл и сепаратор «БЕЛСЕП-Л05» для объема больше 3-4 мл.

Растворы:

1. Фосфатно-солевой буфер (PBS), pH 7,4

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,16г
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,98г
или $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,48г
NaCl	8,10г
Дистиллированной воды до	1-литра
Довести pH до 7,4 гидроксидом натрия;	

2. 0,9% NaCl;
3. Раствор Хенкса (HBSS);
4. PBS/BSA: добавить к PBS 0,1% бычьего сывороточного альбумина (конечная концентрация);
5. 0,02% NaN_3 (конечная концентрация) добавляется в PBS/BSA, используемый для отмывания клеточной суспензии и ИММС;

Все реагенты должны быть химически чистыми (!).

6. МкАТ для типирования клеток с последующим выделением не должны быть диагностическими, минимальная концентрация должна составлять 1 мг/мл;
7. ИММС (условия хранения и использования см. в инструкции по применению).

Оборудование и посуда: магнитный сепаратор, проточный цитофлюориметр, центрифуга, микроскоп, пробирки, колбы, пипетки.

Отмывка ИММС

Перед использованием иммуномагниточувствительные микросферы (ПММС, ВММС, АММС) должны быть отмывы. Перенести ИММС в отмывочные пробирки с раствором PBS/BSA и тщательно ресуспензировать. Поместить пробирку в магнитный сепаратор (или магнит), выдержать в течение 2-3 минут и, не снимая пробирку с магнита, снять пипеткой отмывочный раствор. Процедуру повторить 3 раза.

Контролем качества отмывки ИММС служит бесцветный прозрачный раствор буфера и отсутствие в нем конгломератов ИММС при микроскопировании.

Определить концентрацию ИММС методом подсчета в камере Горяева.

Пример: изоляция клеток-мишеней прямым методом с использованием ПММС.

1. Для выделения клеток-мишеней можно использовать лейкосуспензию или моноклеары. Рекомендуемая концентрация клеток - $5 \cdot 10^6$ кл/мл. При работе с лейкосуспензией предлагаем использовать сепаратор "БЕЛСЕП Л-05".

2. Для удаления Т- лимфоцитов, учитывается концентрация их в лейкосуспензии и рассчитывается абсолютное количество в выделенном объеме (допустим, концентрация в исследуемой суспензии Т-лимфоцитов-70%, следовательно в 1 мл суспензии при концентрации клеток - 5×10^6 кл/мл Т-лимфоциты составят $3,5 \times 10^6$ кл;

3. Добавить в суспензию ПММС в концентрации 1:7 по отношению к клеткам-мишеням ($3,5 \times 10^6$ кл : $24,5 \times 10^6$ ПММС, конъюгированные с МкАТ к антигену CD3);

4. Инкубировать в течение 30 мин при 4°C , периодически встряхивая;

5. Поместить пробирки с исследуемым материалом в гнезда сепаратора и выдержать достаточное для разделения время (2-5мин);

6. Удалить отсепарированную негативную фракцию из пробирки, не вынимая последнюю из гнезда сепаратора;

7. Извлечь пробирку с позитивной фракцией (комплексы Т-лимфоцит-микроферы) из сепаратора и 2-3 раза отмыть их в PBS или в растворе Хенкса с использованием магнитного сепаратора.

В зависимости от поставленной цели использовать в дальнейшей работе позитивную или негативную фракцию.

Пример: изоляция клеток-мишеней непрямым методом с использованием ВММС.

1. Для выделения клеток-мишеней непрямым методом к лейкосуспензии или моноклеарной взвеси (рекомендуемая концентрация клеток - $5 - 10 \times 10^6$ кл/мл) необходимо добавить соответствующие МкАТ (см. инструкцию по применению имеющихся у Вас МкАТ) и инкубировать пробы в течение 30 мин при $t = 4^{\circ}\text{C}$ в темноте;

2. После инкубации клетки отмывают 2 мл PBS/BSA, центрифугируя при 200 g в течении 5-7 минут;

3. К суспензии меченых клеток добавить ВММС в концентрации 1:7 по отношению к выделяемой популяции клеток;

4. Инкубировать в течение 30 мин при 4°C , периодически встряхивая;

5. Поместить пробирку с исследуемым материалом в гнезда сепаратора и выдержать достаточное для разделения время (2-5мин);

6. Удалить отсепарированную негативную фракцию из пробирки, не вынимая последнюю из гнезда сепаратора;

7. Извлечь пробирку с позитивной фракцией (комплексы Т-лимфоцит-микроферы) из сепаратора и 2-3 раза отмыть их в PBS или в растворе Хенкса с использованием магнитного сепаратора.

Контролем качества сепарации является отсутствие в негативной фракции комплексов клетка-микрофера, при микроскопии в камере Горяева.

Оценка эффективности выделения клеток-мишеней из клеточной суспензии.

Для исследования эффективности выделения различных типов клеток из суспензий используют клетки, ресуспендированные в растворе Хенкса или PBS (pH 7,2-7,4) в концентрации $2-4 \times 10^6$ кл/мл.

Выделение мононуклеаров на градиенте плотности: 2 мл гепаринизированной крови (20 ЕД гепарина на 1 мл крови) смешивают с равным объемом среды Хенкса или PBS и осторожно наслаивают на градиент плотности фиколл - верографин ($\rho = 1,077$) в центрифужной пробирке (3 объема лейкоцитарной массы на 1 объем градиента). Центрифугируют 35-40 минут (300g) при комнатной температуре. Мононуклеарные клетки собирают из интерфазы пастеровской пипеткой, трижды отмывают раствором Хенкса (PBS), осадок ресуспендируют в растворе Хенкса (PBS), доводя концентрацию лимфоцитов до $2-4 \times 10^6$ /мл.

Жизнеспособность клеток до и после сепарации определяют методом окраски трипановым синим.

Учет результатов проводят методом проточной цитометрии или методом люминисцентной микроскопии.

Метод проточной цитометрии: $2-3 \times 10^6$ мононуклеарных клеток в 100 мкл PBS/BSA (pH 7,2-7,4) инкубируют с 20 мкл соответствующих МКАТ в течение 30 мин при $t = 4^\circ\text{C}$ в темноте. После инкубации клетки отмывают 2 мл PBS/BSA, центрифугируя при 200g в течение 5-7 минут. Надосадок удаляют, а к осадку клеток добавляют 20 мкл F(ab)2-фрагментов Ig кролика против мышиных антител, меченых ФИТЦ (НПЦ "МедБиоСпектр", Москва). Далее встряхивают пробирку с ингредиентами и инкубируют в течение 45 минут при 4°C в темноте; после чего клетки дважды отмывают 2 мл PBS центрифугированием при 300g в течение 5-7 минут. Затем осадок ресуспендируют в 500 мкл 1% параформальдегида.

Для каждой пробы необходимы следующие контроли:

1. контроль аутофлуоресценции - вместо МКАТ добавляют к суспензии клеток PBS;

2. негативный контроль прокрашивания - вместо МКАТ- ФИТЦ- конъюгированный изотип антител в такой же концентрации, как и МКАТ;

3. контроль на неспецифичность связывания - надосадочная жидкость, полученная после сепарации клеток, инкубированных с иммуномагнитными микросферами, не несущими моноклональных антител.

Суспензию меченых лимфоцитов измеряют на проточном цитофлуориметре. В каждом образце сосчитывают 2000-5000 клеток.

Метод люминисцентной микроскопии: $2-3 \times 10^5$ клеток в 30 мкл раствора Хенкса инкубируют в пробирке объемом 1 мл с 20 мкл соответствующих моноклональных антител в течение 30 мин при комнатной температуре. После инкубации клетки отмывают 1 мл физиологического раствора, центрифугируя при 200g в течение 2-3 минут. Надосадок удаляют, а к осадку клеток добавляют 20 мкл F(ab)2-фрагментов Ig кролика против мышиных антител, меченых ФИТЦ. Далее встряхивают пробирку с ингредиентами и инкубируют в течение 40 минут при комнатной температуре, после чего клетки дважды отмывают 1 мл физиологического раствора центрифугированием при 300g в течение 10 минут. Затем осадок ресуспендируют в 30 мкл 0,9% NaCl и взвесь клеток помещают на предметное стекло с 12 лунками из парафильма диаметром 7 мм, из расчета 1 капля на лунку. Предварительно стекло обрабатывают в течение 30 - 45 минут раствором поли-L-лизина (0,5 мг/мл) («Serva», Германия) во влажной камере (чашки Петри с фильтром) при 37°C. Взвесь клеток адсорбируют на стекле в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем физиологический раствор из лунок осторожно отсасывают пипеткой и вносят в лунки 20 мкл 50% глицерина на 0,9% NaCl. Объектив люминисцентного микроскопа осторожно опускают в лунку на стекле и учитывают свечение, которое имеет форму окружности по мембране клетки. Определяют число светящихся клеток на 200 лимфоцитов. Реакцию можно учитывать в течение 24 часов после постановки. Используют два варианта контроля: 1 - клетки без добавления МКАТ и F(ab)2-фрагментов, меченых ФИТЦ; 2 - клетки без добавления МКАТ, обработанные F(ab)2-фрагментами, мечеными ФИТЦ.

Оценку свечения производят визуально по четырехбалльной шкале:

(++++), - очень яркая флюоресценция по периферии клетки, четко контрастирующая с темным фоном клетки;

(+++), - яркая флюоресценция периферии клетки, четко контрастирующая с темным фоном клетки;

(++), - свечение клетки, четко контрастирующее с темным фоном;

(+), - слабое свечение клетки, клетка не контрастирует с темным фоном;

(-), - нет свечения.

Диагностическим критерием служит свечение (++)

Заключение

Описанный метод быстро расширяет сферу своего использования. В лечебных целях иммуномагнитная сепарация клеток применяется при трансплантации костного мозга. С ее помощью проводят деплецию Т-лимфоцитов из аллотрансплантата костного мозга доноров, что используется для предупреждения развития реакции трансплантат-против-хозяина и выделения CD19, CD20, CD22 (HLA Class II) положительных В-лимфоцитов из периферической крови для последующего их типирования по системе HLA-DR с целью подбора доноров. Клеточная сепарация применяется для изоляции опухолевых клеток из аутологичного костного мозга при лечении гематологических заболеваний. Кроме того, иммуномагнитная сепарация начала широко использоваться в клиниках для выделения стволовых CD34+ клеток с целью последующего реопулирования КМ у больных гемобластозами и в случае тотального облучения.

В диагностических целях иммуномагнитная сепарация проводится для определения иммунного статуса организма, получения тканевых культур и постановки различных цитоиммунных реакций, в научно-исследовательских работах для специфического выделения клеток-мишеней по поверхностным CD антигенам.

Магниточувствительные полимерные микросферы широко применяются для связывания поверхностных антигенов мембран клеток с целью сепарации как клеток, так и ферментов, микроорганизмов, вирусов, что является необходимостью в научной и клинической практике.

В заключение необходимо отметить, что описанный комплекс успешно используется в ЦНИЛ Витебского государственного медицинского университета в процессе экспериментальной сепарации субпопуляций лимфоцитов из суспензии клеток периферической крови доноров. При проведении иммуномагнитосепарации рекомендуем соблюдать следующие условия:

- гепаринизированная кровь 20 ЕД/мл, 2-8°C;
- разведение крови 1:1 в фосфатно-солевом буфере (PBS) или растворе Хенкса;
- соотношение клеток и микросфер для образования розеток - 1:7;
- концентрация клеток в суспензии до инкубации с ИММС должна составлять $5 \cdot 10^6$ кл/мл;
- жизнеспособность клеток должна быть не менее 95%;
- инкубация с МКАТ в течение 30 мин.

ОБОСНОВАНИЕ МЕДИКО-СОЦИАЛЬНОГО ПРЕИМУЩЕСТВА МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАБОРАТОРНЫХ МАГНИТНЫХ СЕПАРАТОРОВ ТИПА «БЕЛСЕН»

В настоящее время трансплантация костного мозга (ТКМ) или гемопоэтической стволовой клетки является методом выбора при лечении более 60 врожденных и приобретенных иммунодефицитных и гематологических заболеваний. Серьезным фактором, ограничивающим применение такой операции в клинике, является развитие у 40-80% реципиентов реакции трансплантат-против-хозяина (РТПХ), причем у 1/3 из них это осложнение является причиной смерти. Вопросы профилактики развития острой РТПХ относятся к одним из самых сложных в трансплантологии кроветворных клеток. Претрансплантационная очистка клеток гемопоэтического трансплантата от Т-лимфоцитов (ТДК), ответственных за развитие РТПХ, представляется наиболее радикальным средством предупреждения как острой, так и хронической реакции. Теоретически успешная Т-депция должна приводить к уменьшению выраженности реакции хозяин против трансплантата, устранять проявления РТПХ и исключить необходимость полной совместимости донора и реципиента.

Из множества методов ТДК, используемых для профилактики острой РТПХ при АТКМ наиболее эффективным является иммуномагнитная сепарация. Метод, активно применяемый в медицине для диагностических и лечебных целей, как более мягкая процедура очистки, при которой с одновременным удалением подавляющегося большинства клеток-мишеней сохраняется их жизнеспособность и жизнеспособность оставшейся популяции.

Однако в странах СНГ в настоящее время магнитные сепараторы не выпускаются, хотя потребность их для использования в клинической практике постоянно возрастает, что частично компенсируется импортными поставками фирмами "Dynal", Норвегия, "Baxter", США, "Milteyni Biotec", Германия. В ЦНИЛ ВГМУ был разработан комплекс для иммуномагнитной сепарации клеток-мишеней из суспензии, состоящий из иммуноактивных микросфер (ИММС) и магнитного сепаратора. Этот комплекс уникален и не имеет аналогов как в Республике Беларусь, так и в странах СНГ.

Разработанная методика сепарации клеток-мишеней может быть использована для диагностических и научно-исследовательских целей и имеет все перспективы для широкого внедрения в онкологию, трансплантологию, гематологию, иммунологию, генной инженерии и научно-исследовательской работе в области медико-биологических наук.

ОТРЫВНОЙ ЛИСТ

УЧЕТА ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ

Направлять в Витебский государственный медицинский университет
(210023 г. Витебск пр. Фрунзе, 27, медуниверситет, Центральная научно-
исследовательская лаборатория).

1. Методические рекомендации «**Использование лабораторных магнитных
сепараторов типа “БЕЛСЕП” для выделения очищенных клеточных
популяций из клеточных суспензий**».

2. Утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь
«_» _____ 200_ г.

3. _____

(кем и когда получены)

4. Количество лечебно-профилактических учреждений, которые внедряли
методы профилактики, диагностики и лечения, предложенные данным
документом

5. Формы внедрения (семинары, подготовка и переподготовка специалистов
и др.), результаты применения метода (количество наблюдений за 1 год и
эффективность) _____

6. Замечания и пожелания (текст):

Подпись _____

(должность, Ф.И.О. лица, заполнившего карту)

Дата заполнения _____

Примечание: Пункты 3-6 заполняются учреждениями, применившим
методические рекомендации.

Библиотека ВГМУ



Подписано в печать 13.07.2000 г. Формат 60х84 1/16.
Бумага типографская №2. Компьютерный набор. Усл. печ. листов 0,98.
Тираж 100 экз. Заказ № 44.

Издательство Витебского государственного медицинского университета.
210602, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27. Лицензия ЛВ № 91 от 22.12.97 г.

Отпечатано на ризографе в Витебском государственном
медицинском университете.
210602, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27. Лицензия ЛП № 326 от 05.01.99 г.